Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. J. Mallach

POSTMORTALE DEGRADATION MENSCHLICHER MYOFIBRILLÄRER PROTEINE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Rudolf Erlinger
aus Modena

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0037

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. J. Mallach

POSTMORTALE DEGRADATION MENSCHLICHER MYOFIBRILLÄRER PROTEINE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Rudolf Erlinger
aus Modena

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof Dr. med. H. Haselmann

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. H.-J. Mittmeyer
(Prof. Dr. med. H. J. Mallach)

INHALTSVERZEICHNIS Seite

1.	EINLEITUNG	5
1.1.	Allgemeine Vorbemerkungen über Muskelproteine	7
1.2.	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	9
2.	MATERIAL und METHODIK	10
2.1.	Muskelproben	10
2.1.1.	Skizzierung der untersuchten Fälle	10
2.2.	Myofibrillenpräparation	13
2.3.	Vorbereitung der Proteinproben	14
2.4.	Herstellung der Polyacrylamidgele	14
2.5.	Elektrophoretische Auftrennung	15
2.6.	Fixieren, Färben und Entfärben der Gele	16
2.7.	Densitometrische Auswertung	16
2.8.	Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien und sonstigen Materialien	17
3.	UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE	18
3.1.	Qualitative Darstellung der myofibrillären Proteine	18
3.2.	Quantitative Erfassung der myofibrillären Proteine	22
3.3.	Qualitative Veränderungen in der postmortalen Phase	25
3.4.	Quantitativ erfassbare Veränderungen in der postmortalen Phase	27
3.4.1.	Postmortales Intervall und relativer Proteinanteil	27
3.4.2.	Korrelativer Zusammenhang zwischen postmortalem Intervall und relativem Proteinanteil	27

Seite

4. DISKUSSION 34

5. ZUSAMMENFASSUNG 41

6. LITERATURVERZEICHNIS 42

1. EINLEITUNG

In den letzten Jahren sind eine Reihe von Arbeiten zum postmortalen Protein-Katabolismus erschienen (BONTE, 1975, Übersichtsreferat), die unter anderem auch die Bestimmung der Todeszeit zum Gegenstand hatten. So untersuchten BONTE und RUSTEMEYER (1975) das Verhalten der freien Aminosäuren in faulendem Leberbrei mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie. Sie stellten einen zweiphasigen Anstieg der postmortalen Aminosäurespiegel mit Gipfel am Ende der ersten und nach der dritten Woche fest. Durch Herstellen anaerober Verhältnisse und durch Zusatz eines Antibiotikums konnten sie außerdem nachweisen, daß postmortal zunächst die Proteolyse gegenüber dem Aminosäurenabbau überwiegt. Sie interpretierten ihre Ergebnisse dahingehend, daß anfangs Eigenenzyme dominieren und später bakterielle Proteasen die Hauptrolle beim postmortalen Proteinabbau spielen. Diese Annahme konnten BONTE, BLEIFUSS und VOLCK (1976) durch quantitative Untersuchungen der Brusthöhlenflüssigkeit von faulenden Hunden bestätigen. Hierbei zeigte sich, daß in der frühen postmortalen Phase Autoenzyme proteolytisch wirken und erst ab dem 20. postmortalen Tag bakterielle Prozesse überwiegen. BONTE, POHLIG, SPRUNG und BLEIFUSS (1976) berichteten über Blut-Faulversuche nach Beimpfung mit verschiedenen Mikroorganismen. Die Befunde lassen annehmen, daß mikrobielle Enzyme nicht nur allein für den Aminosäuren-Weiterabbau verantwortlich sind, sondern auch eine wesentliche Bedeutung bereits für die eigentliche Proteolyse in der Frühphase der postmortalen Proteindegradation haben. BONTE, JOHANSSON, GARBE und BERG (1976) pulverisierten Skeletteile mit Liegezeiten zwischen fünf und 2 500 Jahren. Durch saure Hydrolyse und Auftrennung der

vorwiegend kollagenogenen Aminosäuren fanden sie, daß sich mit zunehmender Liegezeit die Konzentrationen der gebundenen Aminosäuren mit einer überraschend engen zeitlichen Korrelation verringern. Die Lagerungsbedingungen scheinen auf diesen Prozeß keinen wesentlichen Einfluß zu nehmen. BONTE und KLEINSORGE (1977) überließen enukleierte Schweineaugen bis zu acht Tagen bei 20° C der Autolyse. Bei der Untersuchung der Glaskörperflüssigkeit zeigte sich, daß die meisten freien Aminosäuren am zweiten und dritten Tag ein Maximum erreichten. Speziell das Arginin zeigte am Ende des ersten Tages ein hohes Maximum und verringerte sich bis zum vierten Tag signifikant auf Nullwerte. Eine bisher nicht identifizierte, ninhydrinpositive Substanz erschien nie vor dem zweiten Tag, nahm aber dann bis zum Versuchsende sehr stark an Konzentration zu.

Die ersten elektrophoretischen Auftrennungen von Muskelproteinen im Hinblick auf die Todeszeit erfolgten von DERVILLÉE und RIGOT (1963), die in den Proteinogrammen von Skeletmuskelextrakten vom Kaninchen mehrere Fraktionen fanden, die in den ersten 24 Stunden post mortem weitgehend erhalten blieben. Nach 24 Stunden kam es zu einem fortschreitenden Zerfall im Myoalbuminbereich und schließlich zu Mobilitätsänderungen einzelner Fraktionen. In einer zweiten Arbeit teilten DERVILLÉE und BRUNET-ANTIGNY (1964) Untersuchungsergebnisse über zeitabhängige Veränderungen in Muskelproteinogrammen mit, wobei sie insbesonders auf die Bedeutung der Temperatur hinwiesen.

Mit der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese wurden von SCHWEND (1977) und von MITTMEYER (1978) lösliche Proteine des menschlichen Skeletmuskels untersucht und hierbei ebenfalls zeitabhängige Veränderungen festgestellt. Erste Ergebnisse über den postmortalen Abbau

der myofibrillären Proteine (Kaninchenmuskel) wurden von VÁNDOR und JÓZSA (1978) mitgeteilt.

1.1. Allgemeine Vorbemerkungen über Muskelproteine

Bei den Muskelproteinen unterscheidet man zwischen sarkoplasmatischen und myofibrillären Eiweißkörpern. Die sarkoplasmatischen Proteine bestehen aus den Proteinen der Zellorganellen und den vielen kleinen, aber notwendigen Enzymen für das normale Funktionieren einer jeden Zelle. Hierbei machen die Enzyme der Glykolyse und assoziierte Proteine wie die Kreatinkinase etwa 70 bis 80 % der gesamten sarkoplasmatischen Proteine aus. Nach dem Abtrennen der Zellorganellen wie Membranen, Kernen, Mitochondrien, Ribosomen und der löslichen Proteine, erhält man die kontraktilen Einheiten der Muskelzelle, die Myofibrillen. Die Myofibrille selbst ist die kleinste kontraktile Einheit des Muskels und besteht aus einem hochorganisierten Komplex von kontraktilen Proteinen wie Myosin, Aktin und weiteren strukturellen sowie regulatorischen Proteinkomponenten (HUXLEY, 1969; LAKI, 1971).

Große Fortschritte machte das Studium des myofibrillären Proteinkomplexes mit der Entwicklung der Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Es konnten damit die Molekulargewichte, die strukturelle Zusammensetzung und der Reinheitsgrad dieser Proteine bestimmt werden (WEBER und OSBORN, 1969; SENDER, 1971; SCOPES und PENNY, 1971).

So besteht das Myosin (Molekulargewicht 480 000 Daltons), ein hexameres Protein, aus zwei schweren Ketten (MG 200 000 Daltons) und vier leichten Ketten (MG 16 000 bis 25 000 Daltons) (LOWEY und Mitarbei-

ter, 1969). Der Aktinpomplex besteht aus Aktin (MG 45 000 Daltons), Troponin T (MG 37 000 Daltons), Tropomyosin (MG 35 000 Daltons), Troponin I (MG 23 000 Daltons) und Troponin C (MG 14 000 Daltons) (WILKINSON und Mitarbeiter, 1972).

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen schematisch die Anordnung der myofibrillären Proteine und ihre Funktionsstellung.

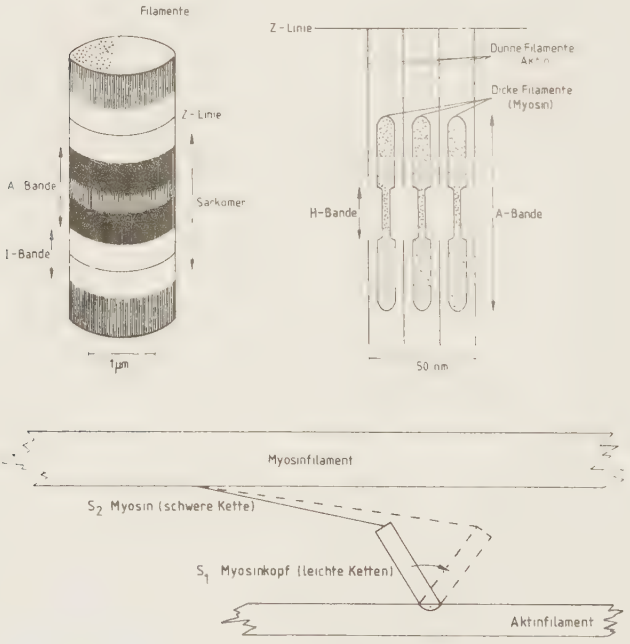


Abbildung 1

Schematische Darstellung eines kurzen Segmentes der Myofibrille (oben links), der myofibrillären Proteine (oben rechts) in Anlehnung an HEILMEYER, RÜEGG und WIELAND (1976), und der aktiven Kontraktion durch Veränderung des Winkels S_1/Aktin (unten) in Anlehnung an HASSELBACH und KRAMER (1975).

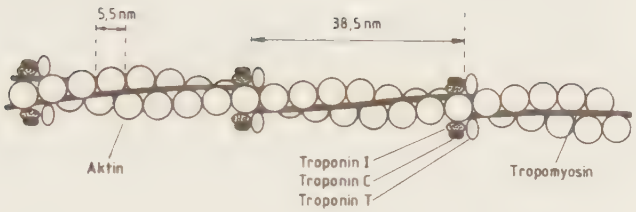


Abbildung 2

Struktur des Aktin/Tropomyosin/Troponin-Komplexes (dünnes Filament) in Anlehnung an HEILMEYER, RÜEGG und WIELAND (1976).

1.2. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Speziell vom Menschen liegen bislang keine Untersuchungen über die postmortale Proteolyse myofibrillärer Eiweißkomponenten vor. Die vorliegende Arbeit befaßt sich deshalb unter praktischen Gesichtspunkten mit der Frage, ob die am Leichenmuskel ablaufende Zersetzung der myofibrillären Proteine als Parameter für die Eingrenzung des postmortalen Zeitintervalles geeignet ist. Dabei wird von der Vorstellung ausgegangen, daß die einzelnen Proteinbausteine des kontraktilen Apparates in einem quasi stöchiometrischen Mengenverhältnis zueinander vorhanden sind. Weiterhin wird angenommen, daß postmortal zunächst autolytische Proteinabbauvorgänge ablaufen, wobei bestimmte Proteine früher und andere Proteine später zersetzt werden. Die unterschiedlichen Abbaugeschwindigkeiten müßten sich demnach in einer zeitabhängigen Veränderung der stöchiometrischen Proteinzusammensetzung niederschlagen.

2. MATERIAL und METHODIK

2.1. Muskelproben

Die zu untersuchenden Skeletmuskelproben wurden bei gerichtlichen Leichenöffnungen entnommen. Zur Analyse dienten Muskelstücke aus der Wade (M. triceps surae). Die Muskelproben wurden nach der Entnahme umgehend bei -20° C eingefroren. Bei den berücksichtigten Fällen war die Todeszeit durchweg bekannt. Die in der Arbeit angegebenen postmortalen Zeitintervalle (Stunden post mortem) beziehen sich auf den Zeitpunkt des Einfrierens der Muskelprobe bei -20° C. Es wurde außerdem darauf geachtet, daß in keinem der ausgewerteten Fälle Muskulatur mit degenerativen oder anderen Erkrankungen zur Untersuchung kam.

2.1.1. Skizzierung der untersuchten Fälle

Untersucht wurden 15 Obduktionsfälle, wobei es sich um 5 weibliche und 10 männliche Leichen handelte. Die postmortale Liegezeit variierte zwischen 18 und 60 Stunden. Das erreichte Lebensalter lag zwischen 16 und 78 Jahren. Es handelte sich durchweg um plötzliche Todesfälle, die im Einzelnen hier kurz skizziert seien.

Fall 1 (L 186/77) : 27 jähriger Mann, der als Fußgänger von einem alkoholisierten PKW-Fahrer erfaßt wurde und hierbei multiple Verletzungen erlitt. Bei der Sektion zeigte sich ein fast vollständiger Abriß des Hirnstammes im Bereich der Brücke und der Hirnschenkel.

Fall 2 (L 187/77) : 16 jähriges Mädchen, das als Beifahrerin an einem Verkehrsunfall beteiligt war. Sie verstarb durch ein akutes Herz-Kreislaufversagen unklarer Genese.

Fall 3 (L 188/77) : 78 jährige Frau, die bei einem Verkehrsunfall auf dem Beifahrersitz durch Genickbruch (Bruch des ersten Halswirbelkörpers und Abriß des Dens des zweiten Halswirbelkörpers) getötet wurde.

Fall 4 (L 189/77) : 20 jähriger Mann, der als Sozius mit dem Motorrad aus der Kurve getragen wurde und hierbei multiple Verletzungen erlitt : Abriß der Brustwirbelsäule von der Lendenwirbelsäule, Lungenzerreißungen beidseits, Zerreißungen der Leber und der Milz.

Fall 5 (L 191/77) : 60 jähriger Mann, der im Bodensee ertrank.

Fall 6 (L 193/77) : 17 jähriger Elektrikerlehrling, der während der Arbeit beim Berühren einer schadhaften, unter Strom stehenden Kabeltrommel getötet wurde.

Fall 7 (L 194/77) : 67 jährige Frau, Alkoholikerin, die unter starken Depressionen litt. Tod durch typisches Erhängen (Suizid).

Fall 8 (L 198/77) : 34 jährige Frau, die sich in suizidaler Absicht aus dem Zug stürzte. Hierbei erlitt sie multiple Verletzungen, vor allem Zertrümmerungen im Bereich des Schädels.

Fall 9 (L 199/77) : 18 jähriger Mann, der von einem Zug überfahren wurde. Hierdurch Zerstückelung und Zermalmung.

Fall 10 (L 202/77) : 39 jähriger Mann, der in suizidaler Absicht Autoabgase in das Wageninnere leitete und an einer Kohlenmonoxydvergiftung verstarb.

Fall 11 (L 203/77) : 57 jähriger Mann, der in alkoholisiertem Zustand vom Gehweg auf die Fahrbahn stürzte und von einem PKW überrollt wurde. Hierbei erlitt er multiple innere Verletzungen (ausgedehnte Lungenquetschung, Leber- und Milzruptur).

Fall 12 (L 207/77) : 44 jähriger Mann, der an einem akuten Herz-Kreislaufversagen unbekannter Ursache verstarb.

Fall 13 (L 208/77) : 24 jähriger Mann, der auf einem unbeschrankten Bahnübergang in seinem PKW von einem Schienenbus erfaßt wurde. Er verstarb am Unfallort (Herz- und Lungenkontusion, Leber- und Milzeinrisse).

Fall 14 (L 210/77) : 49 jähriger Mann, der beim Überqueren einer Straße von einem PKW erfaßt wurde. Er wurde durch Schädel-Hirnzertrümmerung auf der Stelle getötet.

Fall 15 (L 211/77) : 39 jährige Frau, die an einem akuten Herz-Kreislaufversagen bei Pankreasapoplexie verstarb.

2.2. Myofibrillenpräparation

Die Präparation der Myofibrillen erfolgte in Anlehnung an PORZIO und PEARSON (1977).
Ein ca. 10 g schweres Muskelstück wurde hierzu mit einem Skalpell in kleine Würfel von ca. 2 mm Kantenlänge zerschnitten und in einem 100 ml Erlenmeyerkolben in 50 ml " Relaxing Puffer " suspendiert.

Relaxing Puffer :
10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 100 mM KCl, 2 mM EGTA, 10 mM NaN_3, 0.2 mM Dithiothreitol, 2 mM $Na_4P_2O_7$ und 25 mg/l Phenylmethylsulfonylfluorid (mit Eisessig auf pH 7.00 eingestellt).

Der Erlenmeyerkolben wurde dann mit zwei Lagen Verbandsmull, die mit einem Gummi am Kolbenhals befestigt waren, verschlossen. Danach wurden die nun abgefaserten und in der Lösung frei schwimmenden Muskelfasern in ein Reagensglas abgekippt und in einer Tischzentrifuge bei 1000 x g für 5 Minuten gesammelt. Der Überstand wurde verworfen und die beschriebene Muskelfaserextraktion mit dem Relaxing Puffer (50 ml) noch zwei mal wiederholt.

Um die so isolierten Myofibrillen von Zellmembranen, Zellkernen und sonstigen Zellbestandteilen weitgehend zu befreien, wurden sie in 5 ml " Waschpuffer " suspendiert (Relaxing Puffer ohne $Na_4P_2O_7$, 0.1 % Triton X-100). Das Reagensglas wurde dann mit Parafilm verschlossen und die Suspension für 2 Minuten kräftig von Hand geschüttelt. Die Myofibrillen wurden, wie bereits beschrieben, mit der Tischzentrifuge gesammelt, der Überstand verworfen und dieser Waschvorgang noch drei mal wiederholt. Die Reinheit der Myofibrillenpräparation kann schließlich mit dem Phasenkontrastmikroskop überprüft werden, wobei als Kriterium die An- bzw. Abwesenheit von Zellkernen herangezogen wird.

2.3. Vorbereitung der Proteinproben

Hierzu wurden die gewaschenen Myofibrillen in 0.5 ml 8 M Harnstoff, 2.5 % Natriumdodecylsulfat, 5 mM Dithiothreitol und 100 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan/Glycin (33 mM Tris und 66 mM Glycin, pH 8.8) unter Schütteln gelöst. Die myofibrilläre Proteinlösung wurde anschließend für fünf Minuten im Wasserbad auf 100° C erhitzt und über Nacht gegen 25 mM Tris/HCl (pH 7.4), 1 mM Dithiothreitol, 0.2 % Natriumdodecylsulfat dialysiert. Die Dialyse erfolgte zunächst mit einem Liter Dialysierpuffer, der nach drei Stunden gegen frischen Puffer ersetzt wurde. Während des Dialysierens sollte mit einem Magnetrührer gerührt werden.

Die Proteinkonzentration der Proben wurde nach der Biuretmethode an einem Spektralphotometer Zeiss PM-Q II bestimmt und mit Dialysierpuffer auf 1 bis 2 mg/ml eingestellt, auf 20 % (v/v) Glycerin gebracht und einige Tropfen Farbstofflösung zugesetzt (Pyronin Y, 250 µg/ml). Die fertigen Proteinproben wurden entweder sofort analysiert oder aber bis zur weiteren Bearbeitung bei -20° C eingefroren.

2.4. Herstellung der Polyacrylamidgele

Für das 10 %ige Acrylamidgelsystem wurde eine Stammlösung aus 25 g Acrylamid und 250 mg N,N'-methylen-bisacrylamid in deionisiertem Wasser (Endvolumen 100 ml) hergestellt. Diese Lösung wurde anschließend über ein trockengepacktes Ionenaustauschermischbett (Amberlite MB-3, 2 x 4 cm Säule) geschickt. An weiteren Stammlösungen werden benötigt : 2.0 M Tris/Glycin (0.5 M Tris und 1.5 M Glycin, pH 8.8), 2.5 % Natriumdodecylsulfat/2.5 mM EDTA, 50 % Glycerin, 1 % N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1 % Ammoniumperoxodisulfat. Die beiden zuletzt genannten Lösungen sollten immer unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden.

Die Acrylamidgele wurden nun hergestellt. Hierzu wurde in 115 mm lange Plexiglasröhrchen mit einem inneren Durchmesser von 6 mm, die auf einer Seite mit Parafilm verschlossen waren, folgende Lösung 100 mm hoch eingefüllt : 10 Teile Acrylamid-Stammlösung + 5 Teile Tris/Glycin + 1 Teil Natriumdodecylsulfat/EDTA + 2.5 Teile Glycerinlösung + 4.5 Teile H_2O + 1 Teil Tetramethylethylendiaminlösung + 1 Teil Ammoniumperoxodisulfatlösung. Das Ammoniumperoxodisulfat diente dabei als Polymerisationsstarter. Es darf deshalb erst unmittelbar vor Einfüllen in die Gelröhrchen der fertigen Lösung zugesetzt werden.
Anschließend wurde die eingefüllte Polymerisationslösung vorsichtig mit 100 ul folgender Lösung überschichtet : 100 mM Tris, 300 mM Glycin, 0.04 % Tetramethylethylendiamin, 0.1 % Natriumdodecylsulfat und 0.004 % Ammoniumperoxodisulfat. Nach der Polymerisation (ca. 60 Minuten) wurde diese Lösung durch 100 ul 100 mM Tris, 300 mM Glycin, 5 % Glycerin und 1 % Natriumdodecylsulfat ersetzt. Nach einer weiteren Stunde waren die Gele gebrauchsfertig.

2.5. Elektrophoretische Auftrennung

Als Elektrophoresepuffer dienten 70 mM Tris, 140 mM Glycin und 0.1 % Natriumdodecylsulfat. Das Auftragevolumen pro Gel betrug 50 bis 100 µl. Dies entspricht einer Proteinmenge von 50 bis 100 µg bzw. 100 bis 200 µg.

Die Stromstärke lag zunächst bei 0.5 mA pro Gel bei einer Spannung von 40 V. Sobald der Farbstoff in das Gel eingedrungen war, wurde die Stromstärke auf 1 mA pro Gel bei 40 V Spannung erhöht. Die Dauer der Elektrophorese betrug 20 bis 22 Stunden. Nach dieser Zeit hatte der Farbstoff das Gelende erreicht.

Zu beachten ist, daß nach dem Aufbringen der zu analysierenden Proteinproben auf die Geloberfläche diese vorsichtig mit Kammerpuffer überschichtet werden sollten bis das obere Röhrchenende erreicht ist. Erst danach kann die obere Kammer mit Puffer aufgefüllt werden.

2.6. Fixieren, Färben und Entfärben der Gele

Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele vorsichtig mit Preßluft aus den Röhrchen gedrückt und sechs Stunden in 25 % (v/v) Isopropanol und 10 % (v/v) Essigsäure fixiert. Die fixierten Gele wurden anschließend 12 Stunden (über Nacht) in 0.01 % Coomassie Brilliant Blue R 250 (gelöst in Methanol/H_2O/Eisessig= 5/5/1 Teile) gefärbt. Die Entfärbung der Gele erfolgte unter wiederholtem Wechseln der Entfärbelösung in 10 % (v/v) Essigsäure und 5 % (v/v) Methanol. Nach dem Entfärben wurden die Gele in der Entfärbelösung (10 % Essigsäure und 5 % Methanol) aufbewahrt.

2.7. Densitometrische Auswertung

Zur densitometrischen Auswertung der unterschiedlich stark gefärbten Proteinbanden wurden die Gele, in der Entfärbelösung liegend, im Durchlicht fotografiert (Nikon und Contax RTS, Rotfilter, Agfapan 100 professional). Die Negative wurden umkopiert, so daß ein positiver Negativfilm vorlag. Anschließend wurden die Positivfilme mit dem Beckman-Mikrozone- Densitometer Modell R-110 photoelektrisch ausgemessen und in Verbindung mit dem Beckman-Mikrozone-Digital-Integrator Modell R-111 mit der Integrator- und der Recheneinheit ausgewertet und die Einzelbanden bzw. Komplexe in rel.%-Werte digital ausgedruckt.

Die Messungen erfolgten mit dem Interferenzfilter für die Wellenlänge 520 nm, dem Neutraldichtefilter von 1.4 CAL, mit der daraus resultierenden Lichtausfallsintensität von 4 %, mit einer Lichtspaltbreite von

0.2 mm und einer Lichtspaltlänge von 2.5 mm. Um bei den resultierenden Zählimpulsen die Speicherkapazität des Rechners nicht zu überschreiten, wurde der " LONG " Bereich gewählt.

2.8. Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien und sonstigen Materialien

Von der Firma Merck, Darmstadt, wurden folgende Chemikalien bezogen :
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Art. Nr. 8382), Glycin (Art. Nr. 4201), Natriumdodecylsulfat (Art. Nr. 2969), Glycerin (Art. Nr. 4094), Titriplex III (EDTA) (Art. Nr. 8418), Ammoniumperoxodisulfat (Art. Nr. 1201), $MgCl_2$ (Art. Nr. 5833), Harnstoff (Art. Nr. 8488), KCl (Art. Nr. 4933), NaN_3 (Art. Nr. 6688), $Na_4P_2O_7$ (Art. Nr. 6591), Isopropanol (Art. Nr. 9634), Methanol (Art. Nr. 6009).

Weiterhin wurden von der Firma SERVA Feinbiochemica, Heidelberg, verwendet :
Acrylamid (Art. Nr. 10674), N,N'-methylen-bis-acrylamid (Art. Nr. 29195), N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (Art. Nr. 35925), Coomassie Brilliant Blue R 250 (Art. Nr. 17525), Pyronin G (Art. Nr. 34075), Molekulargewichtstandards (Art. Nr. 39064), EGTA (Art. Nr. 11290), Triton X-100 (Art. Nr. 37240), Phenylmethylsulfonylfluorid (Art. Nr. 32395), Amberlite MB-3 (Art. Nr. 40721), Visking-Dialysierschlauch 8/32 (Art. Nr. 44104).
Das Dithiothreitol (Art. Nr. D 0632) wurde von der Firma Sigma Chemie, München, bezogen.

3. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

3.1. Qualitative Darstellung der myofibrillären Proteine

Ein typisches Beispiel für die Auftrennung von menschlichen myofibrillären Proteinen mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese zeigt die Abbildung 3. Man erkennt die unterschiedlich starke Ausprägung der einzelnen Proteinfraktionen. Die dargestellten Ergebnisse sind mit tierexperimentellen Untersuchungen über die Zusammensetzung der myofibrillären Proteine im kontraktilen Apparat vergleichbar. So bestimmten LOWEY und Mitarbeiter (1969) das Molekulargewicht der schweren Myosinkette, die sie aus Skeletmuskulatur des Kaninchens isolierten, mit 200 000 Daltons. Sie stellten in dieser Arbeit gleichzeitig auch ein Modell des Myosinmoleküls vor, das auch heute noch seine Gültigkeit hat. In einer weiteren Arbeit beschrieben dann LOWEY und RISBY (1971) die Isolierung und Darstellung der leichten Ketten des Myosins. Sie fanden Molekulargewichte der einzelnen Ketten mit 25 000 Daltons, 18 000 Daltons und 16 000 Daltons. ADELSTEIN, GODFREY und KIELLEY beschrieben 1963 die Isolierung des Aktins aus Kaninchenmuskulatur und bestimmten das Molekulargewicht mit etwa 45 000 Daltons. WILKINSON und Mitarbeiter isolierten 1972 ebenfalls aus Kaninchenmuskulatur die myofibrillären Regulatorproteine. Dabei zeigte sich eine Proteinhauptfraktion mit einem Molekulargewicht von 23 000 Daltons, das Troponin I (I = Inhibitorfaktor der Mg^{2+}-sensitiven ATPase) und zwei weitere Proteinfraktionen mit Molekulargewichten von 37 000 Daltons, das Troponin T, und 14 000 Daltons, das Troponin C. Sie fanden außerdem, daß sich das Troponin C nicht aus frischer Skeletmuskulatur isolieren ließ. Das Auftreten des Proteins mit einem Molekulargewicht von 14 000 Daltons erklärten sie durch

die Einwirkung von muskulärem Kathepsin auf das Troponin I. Das α-Aktinin wurde 1964 von EBASHI, EBASHI und MARUYAMA entdeckt. Eine nähere Beschreibung der Eigenschaften und der Interaktion im myofibrillären Proteinverband scheiterte allerdings an der Inhomogenität und der Unreinheit der isolierten α-Aktinin-Präparationen. Erst GOLL und Mitarbeitern (1972) gelang es das α-Aktinin so zu reinigen, daß eine Charakterisierung gelang. Das Molekulargewicht des α-Aktinins beträgt danach etwa 100 000 Daltons. GOLL und Mitarbeiter (1972) wiesen nach, daß von zehn bis elf Aktin-Molekülen ein α-Aktinin-Molekül gebunden wird. Daraus errechneten sie, daß pro Windung der α-Helix des Aktins ein Molekül α-Aktinin gebunden ist. Die Darstellung eines weiteren aus Kaninchenmuskulatur isolierten myofibrillären Proteins gelang OFFER, MOOS und STARR (1973). Es handelte sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 140 000 Daltons, das sogenannte C-Protein. Das C-Protein vermag unabhängig von der Ca^{2+}-Ionenkonzentration die Aktin-aktivierte Myosin-ATPase zu hemmen. In jüngster Zeit isolierten ETLINGER, ZAK und FISCHMAN (1976) aus Kaninchenmuskulatur das M-1-Protein mit einem Molekulargewicht von 190 000 Daltons und das M-2-Protein mit 170 000 Daltons. Sie kombinierten die Proteinisolierungen mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Myofibrillen und vermochten dadurch diese beiden Proteine der M-Linie zuzuordnen. Ebenfalls gelang eine Zuordnung schon bekannter myofibrillärer Proteine, worauf später näher eingegangen wird.

Die bislang unidentifizierten Proteinbanden mit Molekulargewichten über 300 000 Daltons und die schwere Kette (Heavy chain) des Myosins mit einem Molekulargewicht von 200 000 Daltons treten in den Acrylamidgelen in Abbildung 3 deutlich hervor. Ebenfalls gut

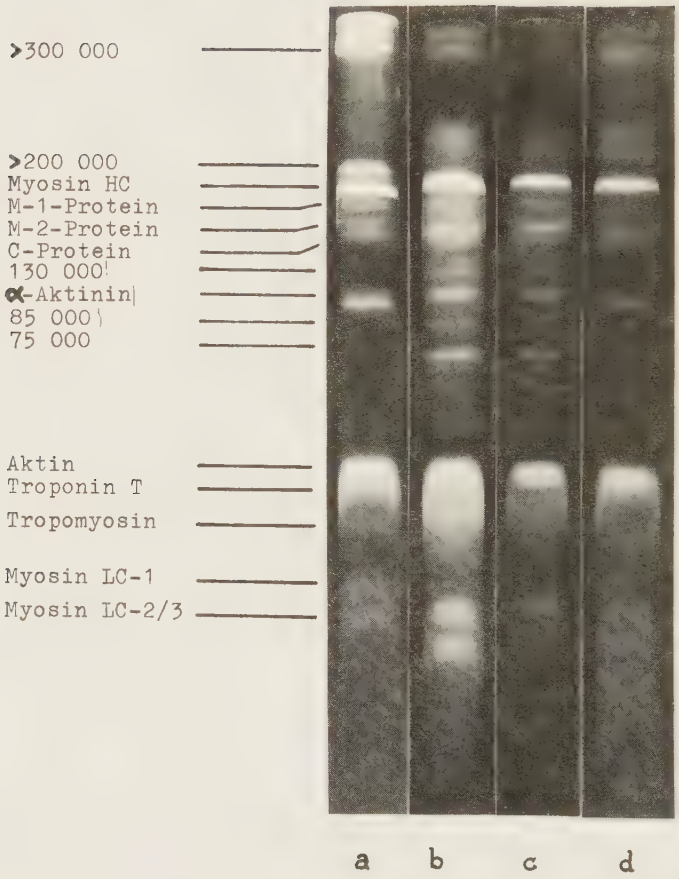


Abbildung 3

Auftrennung menschlicher myofibrillärer Proteine mit der Polyacrylamidgelelektrophorese.

a : Fall 199/77, 18 Std. p.m.
b : Fall 187/77, 41 Std. p.m.
c : Fall 186/77, 44 Std. p.m.
d : Fall 191/77, 60 Std. p.m.

auszumachen sind das α-Aktinin mit einem Molekulargewicht von etwa 100 000 Daltons und das Aktin mit einem Molekulargewicht von 45 000 Daltons. Die Trennschärfe der Polyacrylamidgele erlaubt demgegenüber keine eindeutige Zuordnung der Proteinbanden mit Molekulargewichten unter 45 000 Daltons.

Unmittelbar unter dem Aktin sind das Troponin T und das Tropomyosin schwach zu erkennen. Da sich die Molekulargewichte der leichten Myosinketten (Light chains) sowie des Troponin I und Troponin C wenig unterscheiden, war eine Zuordnung im Molekulargewichtsbereich unter 25 000 Daltons nicht mehr möglich.

Zwischen der schweren Kette des Myosins und dem α-Aktinin zeichen sich angedeutet weiter Banden ab, wobei es sich um das M-1-Protein, das M-2-Protein und das C-Protein handeln dürfte. Im höhermolekularen Bereich als die schwere Myosinkette sind zusätzliche Proteine abzugrenzen, die von PORZIO und PEARSON (1977) bei ihren Untersuchungen am Kaninchenmuskel ebenfalls festgestellt wurden.

3.2. Quantitative Erfassung der myofibrillären Proteine

Die quantitative Zusammensetzung der Einzelkomponenten des kontraktilen Apparates beim Menschen ist bisher nicht bekannt. Auch die vorliegende Untersuchung kann hierüber nur eingeschränkt Auskunft geben, da es sich um Ergebnisse einer begrenzten Stichprobe handelt.

Die quantitativen Verhältnisse wurden durch die densitometrische Auswertung der Proteinogramme erfaßt, wie sie im methodischen Teil der Arbeit dargestellt ist.

Die Abbildung 4 zeigt ein mit dem Beckman-Densitometer ausgewertetes Proteinogramm myofibrillärer Proteine. Daraus sind die wichtigsten Proteine und die mit Hilfe der integrierten Recheneinheit abgegriffenen Flächen zu ersehen. Bei der quantitativen Erfassung der einzelnen Eiweißkomponenten mußten zusätzlich auftretende Fraktionen in den zugehörigen Bereich subsummiert werden. So erkennt man in der Abbildung 5 weitere Fraktionen mit Molekulargewichten von etwa 130 000 Daltons, 85 000 Daltons und 75 000 Daltons, die über die densitometrische Auswertung für den Bereich 5 miterfaßt wurden.

Abbildung 4

Densitometrische Auswertung eines Proteinogrammes myofibrillärer Proteine (Fall 193/77, 27.5 Std. p.m.).

Bereich 1 : 32.1 rel.%
Bereich 2 : 7.1 rel.%
Bereich 3 : 12.4 rel.%
Bereich 4 : 6.7 rel.%
Bereich 5 : 6.4 rel.%
Bereich 6 : 24.5 rel.%
Bereich 7 : 10.5 rel.%

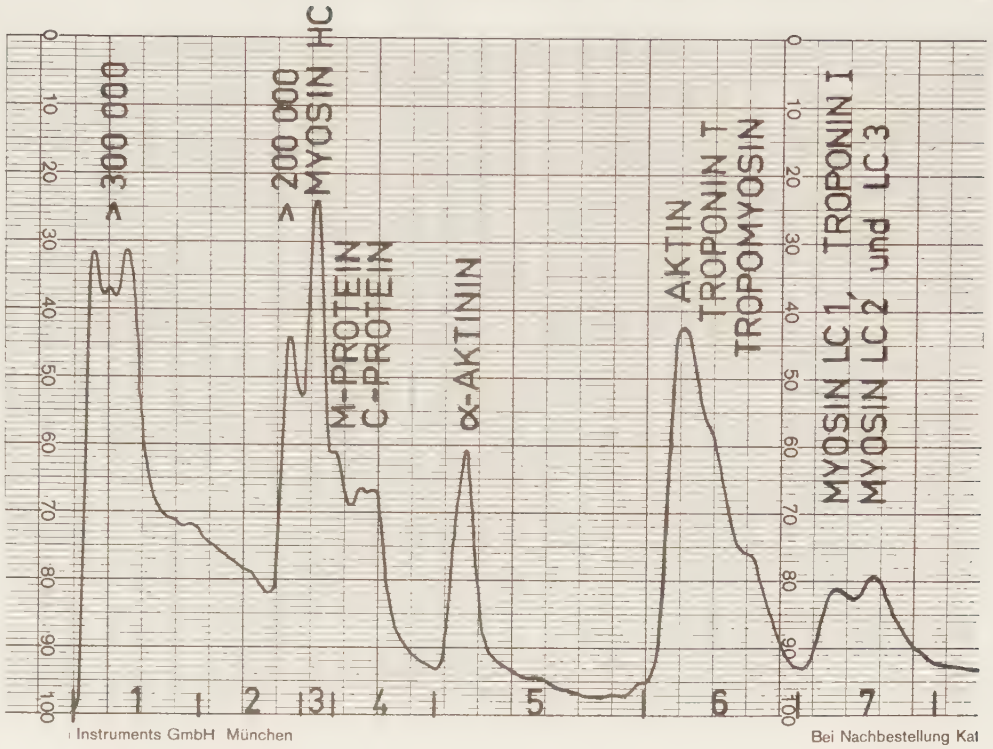
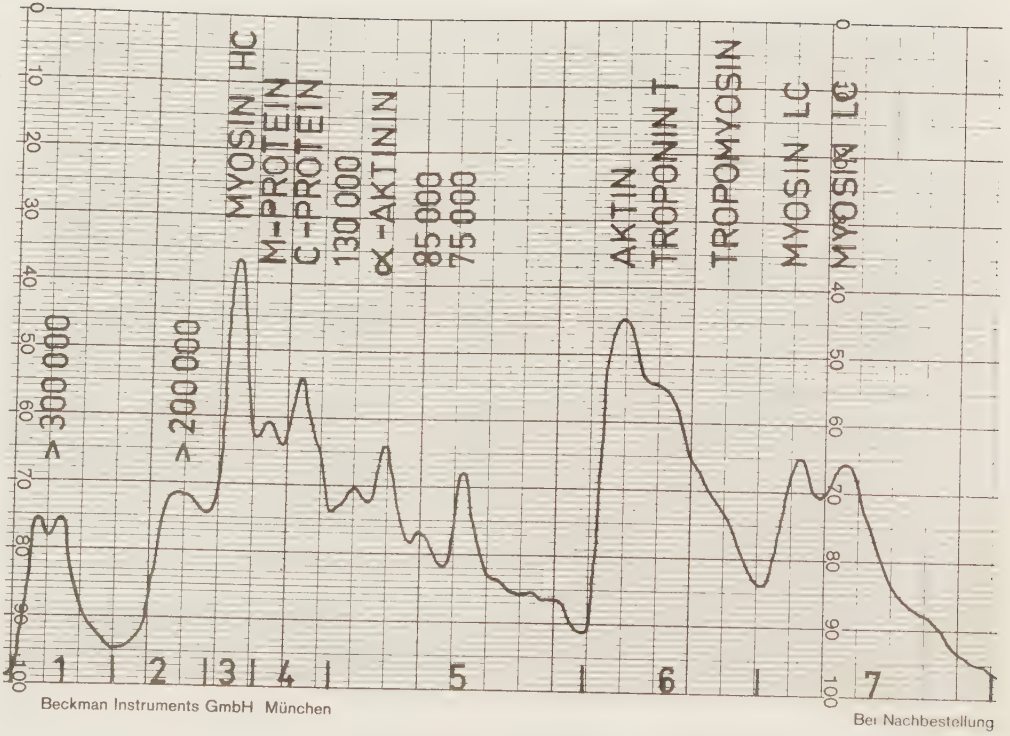


Abbildung 5

Densitometrische Auswertung eines Proteinogrammes myofibrillärer Proteine (Fall 187/77, 41 Std. p.m.).

Bereich 1 : 5.0 rel.%
Bereich 2 : 6.7 rel.%
Bereich 3 : 12.9 rel.%
Bereich 4 : 12.0 rel.%
Bereich 5 : 19.6 rel.%
Bereich 6 : 27.6 rel.%
Bereich 7 : 16.3 rel.%



3.3. Qualitative Veränderungen in der postmortalen Phase

Mit den Elektropherogrammen in Abbildung 6 sollen die wesentlichen zeitabhängigen Veränderungen der myofibrillären Proteine demonstriert werden. Dargestellt sind die myofibrillären Proteine von einer Obduktion nach 18 Stunden post mortem (Fall 199/77) und des Falles 187/77 nach 41 Stunden post mortem. Wie man aus der Abbildung ersieht, stellen sich zum späteren Zeitpunkt die Eiweißkomponenten im niedermolekularen Bereich, also etwa ab der Aktin-Bande, verwaschener dar. Auf diesen Effekt haben bereits VÁNDOR und JÓZSA (1978) hingewiesen. Diesbezüglich haben eigene Faulversuche gezeigt, daß sich nach längerer Zeit (über fünf Tage post mortem) im Bereich der leichten Myosinketten und der Troponine I und C keine Proteine mehr darstellen lassen. In dem hier erfaßten Zeitraum zwischen 18 und 60 Stunden post mortem sind die niedermolekularen Proteine noch nachweisbar, jedoch nicht zuzuordnen.

Mit zunehmender Liegezeit kommt es weiterhin zu einer Verschmelzung der fibrillären Proteine im Bereich zwischen 35 000 und 45 000 Daltons, sodaß sich, wie in der Abbildung 6 zu sehen, ein diffuser Aktin/Troponin T/Tropomyosin-Komplex abzeichnet. Im hochmolekularen Bereich treten mit zunehmender Liegezeit die Proteinbanden mit Molekulargewichten über 300 000 Daltons weniger intensiv in Erscheinung. In dem in der Abbildung 6 rechts wiedergegebenen Gel ist es bereits zu einem fast vollständigen Verschwinden dieser unbekannten Eiweißkomponenten gekommen.

Weiterhin fällt auf, daß sich im späteren postmortalen Intervall im myofibrillären Proteinmuster vergleichsweise zahlreiche Banden darstellen. Man erkennt, daß sowohl zwischen der schweren Kette des

Myosins und dem α-Aktinin, als auch zwischen dem α-Aktinin und dem Aktin zusätzliche Proteinbanden auftreten. Besonders hervorzuheben ist die deutlich ausgeprägte Proteinbande zwischen dem α-Aktinin und dem Aktin, die zwar relativ häufig jedoch nicht grundsätzlich mit zunehmender Liegezeit zur Darstellung kommt.

Abbildung 6

Qualitative zeitabhängige Veränderungen in der Zusammensetzung myofibrillärer Proteine.
Linkes Elektropherogramm : Fall 199/77, 18 Std. p.m.
Rechtes Elektropherogramm : Fall 187/77, 41 Std. p.m.

Die gezeigten Beispiele myofibrillärer Proteinmuster lassen zeitabhängige Veränderungen erkennen, die auf proteolytische Einflüsse zurückzuführen sind.
Die Untersuchung wurde deshalb mit der Fragestellung fortgeführt, ob sich hierbei Gesetzmäßigkeiten erfassen lassen, die es erlauben, das postmortale Zeitintervall einzugrenzen.

3.4. Quantitativ erfassbare Veränderungen in der postmortalen Phase

Wie die qualitativen Untersuchungen gezeigt haben, kommt es offensichtlich neben dem Auftreten neuer Proteinbanden zu einer Intensitätsabnahme einzelner Eiweißkörper. Hieraus muß eine relative Verschiebung in den Proteinogrammen resultieren, die densitometrisch als zeitabhängiger Parameter ausgewertet wurde.

3.4.1. Postmortales Intervall und relativer Proteinanteil

In Tabelle 1 sind die relativen Proteinanteile der jeweils abgegriffenen Protein-Peakflächen geordnet nach dem postmortalen Intervall zusammengestellt. Bei globaler Betrachtung der Werte ist zu erkennen, daß der relative Anteil der niedermolekularen Proteine zunimmt und der der hochmolekularen Eiweißkörper entsprechend abnimmt.

3.4.2. Korrelativer Zusammenhang zwischen postmortalem Intervall und relativem Proteinanteil

Die tabellarisch erfaßten Werte (Tabelle 1) wurden nun im Einzelnen auf ihre Wertigkeit für die Zuordnung des postmortalen Intervalls überprüft. Aus der Abbildung 7 ergibt sich, daß der relative Proteinanteil der hochmolekularen Eiweißkomponenten mit zunehmender Liegezeit abnimmt. Die Relativwerte bewe-

gen sich hierbei zwischen 50 und unter 5 %. Obwohl die Tendenz einer relativen Abnahme für diese noch nicht identifizierten Proteine eindeutig ist, sind jedoch auch größere Abweichungen zu erkennen. Der Korrelationskoeffizient berechnet sich mit -0.7262.

Die Abbildung 8 zeigt, wie der relative Anteil niedermolekularer Proteine im Bereich unter 45 000 Daltons mit der Liegezeit zunimmt. Bei den 15 untersuchten Fällen liegen Werte zwischen rund 10 und über 50 rel.% vor, wobei sich ein Korrelationskoeffizient von 0.8019 berechnet, jedoch einzelne Werte erheblich ausreißen.

Während für die aufgezeigten Bereiche mit Molekulargewichten über 300 000 Daltons und unter 45 000 Daltons deutliche zeitabhängige Verschiebungen vorliegen, sind bei der densitometrischen Auswertung der anderen myofibrillären Proteine keine markanten Zu- oder Abnahmen festzustellen. So deutet sich für die schwere Myosinkette lediglich eine geringe relative Abnahme an ($r = -0.3440$).

Von den niedermolekularen Eiweißkomponenten wurde der zusammengefaßte Aktin/Troponin T/Tropomyosin-Komplex gesondert ausgewertet und, wie die Abbildung 9 zeigt, ein zeitabhängiger Anstieg festgestellt. Die relativen Meßwerte für die 15 untersuchten Fälle liegen zwischen knapp 10 % und über 30 % bei einem Korrelationskoeffizienten von 0.7627.

Die gesonderte Auswertung der niedermolekularen Eiweißkörper mit einem Molekulargewicht unter 26 000 Daltons zeigt ebenfalls einen zeitabhängigen Anstieg, wie die Abbildung 10 zeigt. Die relativen Meßwerte für die untersuchten Fälle liegen zwischen 1 % und 20 % bei einem Korrelationskoeffizienten von 0.7799.

L-Nr.	Std. p.m.	Relativer Anteil im Proteinogrammbereich						
		1	2	3	4	5	6	7
199/77	18	47.6	11.8	15.7	8.3	6.1	8.7	1.7
210/77	19	20.9	14.0	24.9	9.5	3.1	22.9	4.7
203/77	20	39.4	15.4	17.0	7.0	5.2	13.8	2.1
208/77	21.5	24.3	13.5	28.6	10.9	3.0	18.4	1.3
207/77	22	20.4	12.8	16.4	16.4	11.1	18.2	4.6
194/77	26.5	22.6	9.7	15.1	13.2	3.2	22.1	14.0
193/77	27.5	32.1	7.1	12.4	6.7	6.4	24.5	10.5
202/77	30	31.3	14.1	15.6	12.2	8.9	14.6	3.4
198/77	32	38.5	10.4	14.6	12.7	9.4	13.2	1.2
187/77	41	5.0	6.7	12.9	12.0	19.6	27.6	16.3
188/77	43.5	12.6	8.3	11.9	11.0	14.4	24.3	17.5
186/77	44	2.9	6.1	15.6	16.1	17.4	31.4	10.6
211/77	49	6.8	18.1	20.2	15.7	8.7	22.6	7.9
189/77	53	13.1	9.3	11.3	7.1	7.5	32.8	18.8
191/77	60	10.0	10.8	17.8	6.7	2.2	32.2	20.3

Tabelle 1 Relativer Eiweißanteil in den einzelnen Bereichen des Proteinogrammes bezogen auf das postmortale Intervall.

Abbildung 7

Abhängigkeit des relativen Proteinanteils für die unidentifizierten Eiweißkomponenten mit Molekulargewichten über 300 000 Daltons vom postmortalen Intervall.

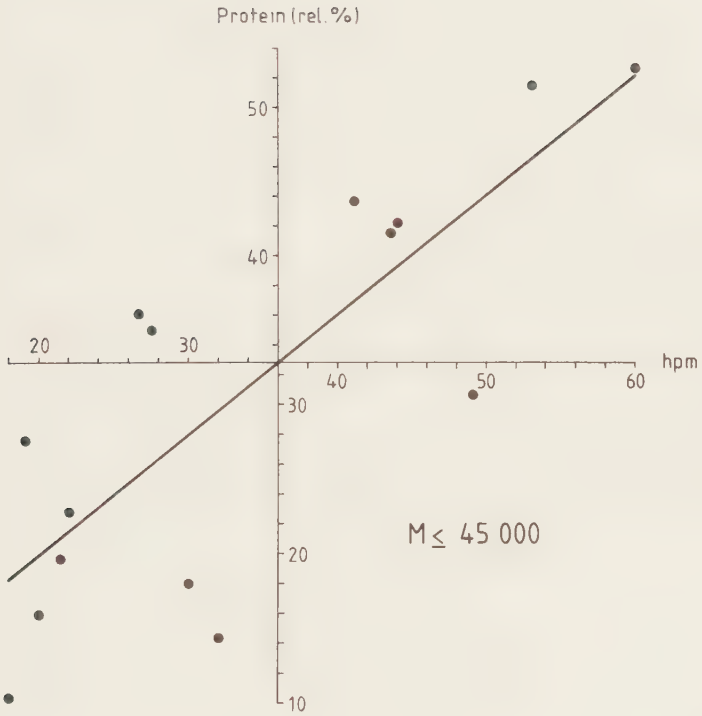


Abbildung 8

Abhängigkeit des relativen Proteinanteils der niedermolekularen myofibrillären Proteine (≤ 45 000 Daltons) vom postmortalen Intervall.

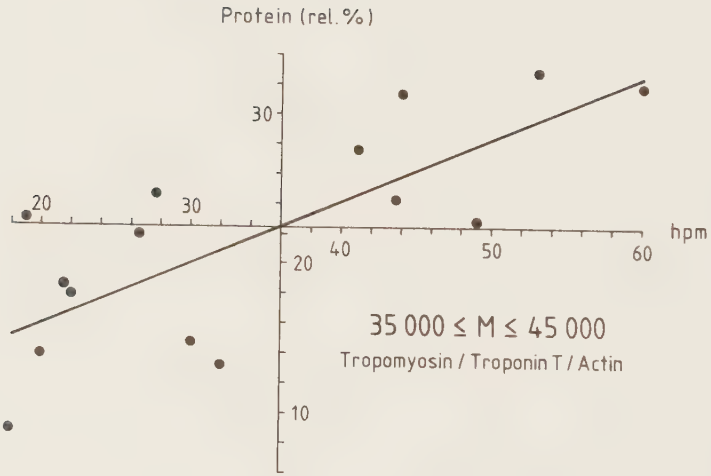


Abbildung 9

Abhängigkeit des relativen Proteinanteils des zusammengefaßten Aktin/Troponin T/Tropomyosin-Komplexes vom postmortalen Intervall.

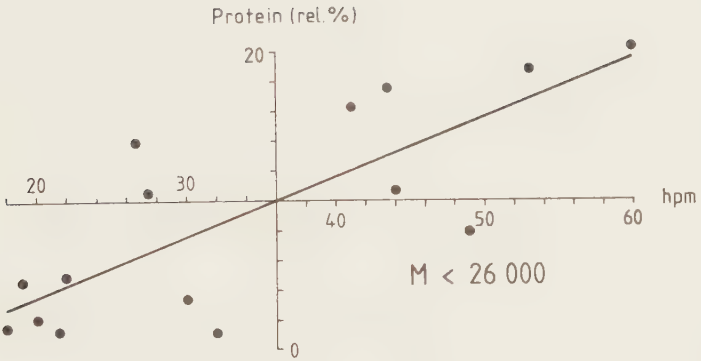


Abbildung 10

Abhängigkeit des relativen Proteinanteils der myofibrillären Proteine mit einem Molekulargewicht unter 26 000 Daltons vom postmortalen Intervall.

4. DISKUSSION

Der postmortale Eiweißabbau und die Dauer des Zerfallsprozesses hängen von verschiedenen Faktoren ab, wie zum Beispiel dem Lagerungsmilieu, der Bakterienbesiedelung, der Art des Eiweißes, von intrazellulären pH-Verschiebungen, dem Ausfall der energieübertragenden Systeme. Diese im Einzelfall nicht nachvollziehbaren Parameter schränken die Bedeutung der bis zu einem gewissen Grade gesetzmäßig ablaufenden chemischen Abbauvorgänge für forensische Zeitstellungen ein.

In der frühen postmortalen Phase scheinen die zelleigenen Endopeptidasen, wie das Kathepsin B und die Dipeptidyl-Peptidase, und die Exopeptidasen, wie die Leucin-Aminopeptidase und die Dipeptidyl-Peptidase, eine überragende Rolle bei der Proteolyse zu spielen. So fanden SCHMIDT und Mitarbeiter (1961) unter anaeroben und keimfreien Bedingungen einen Anstieg der Carboxyl- und Aminogruppen, was darauf zurückzuführen ist, daß die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen keine Kopplung mit energieliefernden Reaktionen erfordert. Mit anderen Worten ausgedrückt bedeutet dies, daß zelleigene Proteinasen auch nach dem Ausfall der Atmungskette weiter aktiv bleiben und katabole Vorgänge ein Übergewicht erhalten.

Wie die Untersuchungsergebnisse gezeigt haben, kommt es mit zunehmender postmortaler Liegezeit zu teilweise charakteristischen und gesetzmäßigen Veränderungen in der Zusammensetzung der myofibrillären Proteine. Diese Veränderungen lassen sich durch die Proteolyse der Myofibrillen erklären, wodurch es zu einer partiellen bzw. zu einer bruchstückartigen Schädigung dieser Grundstruktur kommt. Das führt da-

zu, daß sich nach Isolierung der proteolytisch veränderten Myofibrillen, nur noch ein mehr oder weniger gut erhaltenes myofibrilläres Proteinmuster erfassen läßt. Die proteolytischen Veränderungen können soweit gehen, daß bestimmte Proteine nicht mehr zur Darstellung kommen, weil sie aus dem Proteinkomplex der Myofibrille enzymatisch " herausgebrochen " wurden und dann, löslich geworden, mit der angewandten Isolierungsmethode nicht mehr erfaßt werden können.

Das Auftreten neuer Proteinbanden ist dadurch zu erklären, daß durch proteolytisch wirkende Enzyme bestimmte Struktur- bzw. funktionelle Proteine der Myofibrillen an bestimmten " Sollbruchstellen " gespalten, aber nicht aus dem Strukturverband gelöst werden und somit isoliert werden können. Im Gegensatz zu den spezifisch wirkenden Endopeptidasen, die an bestimmten Sollstellen spalten, bewirken die unspezifisch wirkenden Exopeptidasen eine partielle Proteolyse durch Abbau vom Amino-Ende oder vom Carboxyl-Ende her, wodurch nun die als Anionen vorliegenden Protein-Natriumdodecylsulfat-Komplexe eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel aufweisen. Unter diesem Gesichtspunkt wird verständlich, daß sich einzelne Proteinfraktionen nur noch diffus darstellen, d. h. daß die Proteinbanden mit zunehmend kleiner werdendem Molekulargewicht der betreffenden Proteine breiter werden. Dieser Effekt wird bei den Proteinen mit einem Molekulargewicht unter 45 000 Daltons besonders deutlich.

Wie die Untersuchungen ergeben haben ist bei den Proteinen mit einem Molekulargewicht von über 300 000 Daltons mit zunehmendem postmortalen Intervall eine deutliche Abnahme zu verzeichnen. Ein relativer Pro-

teinanteil von über 20 % am Gesamtbestand der myofibrillären Proteine würde die Aussage zulassen, daß die postmortale Liegezeit unter 40 Stunden betrug. Umgekehrt würde ein Proteinanteil von unter 20 % für ein postmortales Intervall über 40 Stunden sprechen.

Weiter ist zu beobachten, daß eine markante Zunahme der myofibrillären Proteine mit einem Molekulargewicht von 45 000 Daltons und darunter auftritt. Da bei der densitometrischen Auswertung die Fibrillenproteine insgesamt und die Verhältnisse zueinander betrachtet werden, dürfte es sich hierbei um eine relative Zunahme handeln, da die großmolekularen Proteine abnehmen. Danach wäre von der Überlegung auszugehen, daß der Gesamtkomplex Aktin/Tropomyosin/Troponine T,I,C/leichte Myosinketten postmortal zunächst stabil bleibt oder zumindestens nicht in wesentlichem Umfang abgebaut wird. Diese Vorstellung ist mit der molekularen Anordnung des Komplexes Aktin/Tropomyosin/Troponine I,T,C/leichte Myosinketten durchaus vereinbar, da die leichten Myosinketten den " Kopf " des Myosins bilden und als solche über das Troponin an das Aktin gebunden sind.

VÁNDOR und JÓZSA (1978) fanden bei ihren Untersuchungen am Kaninchenmuskel, daß schon zwei Stunden post mortem ein Protein mit einem Molekulargewicht von 30 000 Daltons auftritt, welches sich aus frischer Muskulatur nicht isolieren ließ. VÁNDOR und JÓZSA (1978) vermuten, daß es sich um ein Abbauprodukt des Tropomyosins handelt. Zusätzlich traten etwa acht Stunden post mortem weitere Proteine mit 31 000 und 16 000 Daltons auf. Nach 24 Stunden post mortem fanden sich außerdem hochmolekulare Proteine mit 355 000, 345 000 und 146 000 Daltons, gleichzeitig wurde der α-Aktinin-Streifen schwächer und die Proteine mit 31 000 und 16 000 Daltons waren verschwunden.

Die vorliegenden Ergebnisse stehen teilweise im Gegensatz zu den von VÂNDOR und JÓZSA (1978) berichteten Befunden. Im Bereich der hochmolekularen Proteine über 200 000 Daltons lassen sich bis etwa 40 Stunden post mortem quantitativ große Proteinmengen nachweisen, die mit zunehmender Leichenzeit abnehmen und in manchen Fällen praktisch fehlen. Ob es sich hierbei um Verunreinigungen der Myofibrillenpräparation mit anderen Zellproteinen oder um stabile myofibrilläre Proteinstrukturen handelt, ist unklar. Wahrscheinlicher ist, daß es sich um stabile myofibrilläre Proteinkomplexe handelt. Die von VÂNDOR und JÓZSA (1978) 24 Stunden post mortem gefundenen Proteine mit 355 000 und 345 000 Daltons konnten nicht nachgewiesen werden. Dafür trat im Molekulargewichtsbereich zwischen 200 000 und 300 000 Daltons eine breite und diffuse Proteinzone auf, die sich 60 Stunden post mortem in zwei Proteinbanden mit etwa 240 000 und 270 000 Daltons auftrennt. Diese beiden Proteine wurden von VÂNDOR und JÓZSA nicht beschrieben.

Wie schon erwähnt wurde, gelang es ETLINGER, ZAK und FISCHMAN (1976) durch enzymatische Behandlung von isolierten Myofibrillen, entsprechende Extraktionsmethoden und anschließende vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen der übrig gebliebenen myofibrillären Strukturen das M-1-Protein (190 000 Daltons) und das M-2-Protein (170 000 Daltons) der M-Linie zuzuordnen. Auf die hier erzielten Ergebnisse übertragen bedeutet dies, daß die M-Linie etwa 60 Stunden post mortem geschädigt ist, da sich zu diesem Zeitpunkt keine der M-Linie zuzuordnenden Proteine mehr darstellen lassen.

VÂNDOR und JÓZSA (1978) teilten mit, daß die Konzentration des α-Aktinins mit zunehmender postmortaler

Liegezeit abnehme. Wie MASAKI, ENDO und EBASHI (1967) mittels Antikörper gegen α-Aktinin nachweisen konnten, ist das α-Aktinin ein Bestandteil der Z-Linie. ETLINGER, ZAK und FISCHMAN (1976) beschrieben eine Proteindoppelbande Z-1 und Z-2 mit 90 000 Daltons und ein weiteres Protein mit 60 000 Daltons, die sie eindeutig der Z-Linie zuordnen konnten.

Die eigenen Ergebnisse zeigen etwa 18 Stunden post mortem eine breite Proteinbande im Bereich des α-Aktinins, möglicherweise als Zeichen einer noch intakten Z-Linie. Diese Bande wird mit zunehmender postmortaler Liegezeit schwächer. Nach etwa 40 Stunden treten, in Übereinstimmung mit VÂNDOR und JÓZSA (1978) drei neue Proteine mit Molekulargewichten von 130 000, 85 000 und 75 000 Daltons auf, die nach 60 Stunden post mortem nicht mehr gefunden werden. Bei den beiden Proteinen mit 85 000 und 75 000 Daltons könnte es sich um die von ETLINGER, ZAK und FISCHMAN (1976) beschriebenen Z-Linienproteine Z-1 und Z-2 handeln. Dies würde bedeuten, daß 60 Stunden post mortem außer der M-Linie auch die Z-Linie massiv geschädigt ist.

Schwierig ist die Beurteilung der Situation bei den niedermolekularen myofibrillären Proteinen unter 45 000 Daltons. Im Bereich des Troponin T und des Tropomyosins stellen sich die Proteinbanden mit zunehmender postmortaler Liegezeit breiter und diffuser, gewissermaßen ineinander überfließend, dar. Das Auftreten solcher diffuser Proteinbanden, wie sie im beschriebenen Bereich vorliegen, ist durch eine proteolytisch entstandene Population eines Proteinmoleküls, die innerhalb eines Molekulargewichtsbereiches von 2 000 bis 5 000 Daltons streut, zu verstehen. Bei den untersuchten Fällen trat dieses Phänomen etwa 40 Stunden post mortem auf und legt die Vermutung nahe,

daß der Troponin-Komplex geschädigt ist. Dies steht in guter Übereinstimmung mit VÁNDOR und JÓZSA (1978), die fanden, daß nach 48 Stunden bei 25° C in erster Linie der Troponin-Komplex angegriffen wurde, wodurch die spezifische Aktivität der EGTA-gehemmten ATPase auf ungefähr das siebenfache anwuchs.

Versucht man eine Wertung der erzielten Ergebnisse in Bezug zur Totenstarre, so muß von folgenden Erkenntnissen ausgegangen werden. Es sind zwei Typen von Elementarfilamenten mit verschiedenen Durchmessern zu unterscheiden. Die dickeren Filamente bestehen aus Myosin und liegen in hexagonaler Anordnung zueinander. Die dünneren Aktin-Filamente sind so angeordnet, daß je sechs von ihnen ein Myosin-Filament umgeben. Eine Längenänderung des Muskels erfolgt nun in der Weise, daß die Aktin- und die Myosin-Filamente aneinander vorbeigleiten, ohne ihre Eigenlänge wesentlich zu verändern. Somit hat eine Verkürzung, eine Erschlaffung oder eine passive Dehnung der Muskelfaser eine teleskopartige Verschiebung längenkonstanter Filamente zur Folge. Es scheint zu einer Kippbewegung der leichten Myosinkette, die mit dem Aktin in Verbindung steht, zu kommen, wodurch über die schwere Kette am Myosinfilament gezogen wird. Der aktive Kontraktionsvorgang ist energieabhängig. Hierbei wird in vivo Adenosintriphosphat (ATP) durch das Myosin zu Adenosindiphosphat (ADP) dephosphoryliert. Nach dem Stillstand des Blutkreislaufes und dem Sistieren des oxydativen Energiestoffwechsels bleiben Abbau und Resynthese von ATP zunächst im Gleichgewicht, solange noch ADP aus Kreatinphosphat enzymatisch rephosphoryliert werden kann. Allmählich überwiegt dann die Dephosphorylierung, und die ATP-Konzentration der Muskelzelle nimmt unter der fortdauernden ATPase-Wirkung des Myosins ab. Die in vivo durch das ATP auf den kontraktilen Apparat ausgeübte sogenannte Weich-

macherwirkung fällt aus und der Muskel wird starr.

MALLACH und Mitarbeiter (1965) konnten bei elektronenmikroskopischen Studien an der totenstarren Forellenmuskulatur eine deutliche Abgrenzung der einzelnen Bänder feststellen. Im Z-Streifen waren Filamentverdickungen zu erkennen. Nach Lösung der Totenstarre wurde die Struktur der Muskelfasern homogen, sodaß sich die I-, A- und H-Bänder nicht mehr gegeneinander abgrenzen ließen. Der Z-Streifen war unscharf begrenzt. Auch spätere elektronenmikroskopische Untersuchungen von KRAUSE und ZETT (1973) haben gezeigt, daß es bei der Lösung der Totenstarre offensichtlich zur Entkoppelung der Myofilamente und zu Fibrillenrupturen im Bereich der Z-Streifen kommt.

In Übereinstimmung mit den Ausführungen von MALLACH und Mitarbeitern (1965) und von KRAUSE und ZETT (1973) lassen die vorliegenden Ergebnisse vermuten, daß bei der Lösung der Totenstarre proteolytische Vorgänge innerhalb der Z-Linie eine entscheidende Rolle spielen.

Der Umfang der Untersuchungen ist noch begrenzt, jedoch zeigen die erzielten Befunde, daß im Einzelfall proteolytische Veränderungen an den myofibrillären Proteinen als Parameter bei der Eingrenzung des postmortalen Intervalls herangezogen werden können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Untersuchung der myofibrillären Proteine des M. triceps surae einer Stichprobe von 15 plötzlichen Todesfällen zwischen 18 und 60 Stunden post mortem wurden mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese proteolytische Veränderungen festgestellt, die im Einzelfall als Parameter bei der Eingrenzung des postmortalen Zeitintervalls herangezogen werden können.

Es wird angenommen, daß mit zunehmender postmortaler Liegezeit der Troponin-Komplex geschädigt wird, da sich die Eiweißkomponenten im niedermolekularen Bereich diffuser darstellen. Die myofibrillären Proteine mit Molekulargewichten zwischen 35 000 und 45 000 Daltons verschmelzen zu einem diffusen Aktin/Troponin T/Tropomyosin-Komplex.

Mit zunehmendem postmortalen Intervall treten drei neue Proteine mit 130 000, 85 000 und 75 000 Daltons auf, die der Z-Linie zugeordnet werden könnten. Da diese Proteine etwa 60 Stunden post mortem nicht mehr nachzuweisen sind, wird angenommen, daß die Z-Linie geschädigt ist.

Weiterhin lassen sich etwa 60 Stunden post mortem die der M-Linie zugehörigen Proteine nicht mehr nachweisen, was als Schädigung der M-Linie gedeutet wird.

Die densitometrisch erfaßten Relativwerte für die unidentifizierten Eiweißkomponenten mit Molekulargewichten über 300 000 Daltons nehmen deutlich ab und bewegen sich hierbei zwischen knapp 50 und unter 5 %. Der relative Anteil für die niedermolekularen Proteine und für den zusammengefaßten Aktin/Troponin T/Tropomyosin-Komplex steigt demgegenüber an mit Werten zwischen rund 10 und über 50 % bzw. zwischen knapp 10 und über 30 %.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ADELSTEIN, R.S. and W.M. KUEHL

Structural studies on rabbit skeletal actin. I. Isolation and characterization of the peptides produced by cyanogen bromide cleavage. Biochem. 9, 1355-1364 (1970)

ADELSTEIN, R.S., GODFREY, J.E. and W.W. KIELLEY

G-Actin : Preparation by gel filtration and evidence for a double stranded structure. Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 34-38 (1963)

BONTE, W.

Der postmortale Proteinkatabolismus. Beitr. gerichtl. Med. 33, 57-75 (1975)

BONTE, W. und V. KLEINSORGE

Autolysebedingte Konzentrationsveränderungen der freien Aminosäuren im Glaskörper des Auges. Beitr. gerichtl. Med. 35, 133-143 (1977)

BONTE, W. und J. RUSTEMEYER

Quantitative Untersuchungen zur Entwicklung des Aminosäure-Spektrums in faulender Leber. Z. Rechtsmed. 76, 293-306 (1975)

BONTE, W., BLEIFUSS, J. and J. VOLCK

Experimental investigations in post-mortem protein degradation. Forensic Sci. 7, 9-22 (1976)

BONTE, W., JOHANSSON, J., GARBE, G und S. BERG

Die Bestimmung des Aminosäurespektrums als Hilfsmittel bei der Datierung von Skelettfunden.
Arch. Kriminol. 158, 163-174 (1976)

BONTE, W., POHLIG, K., SPRUNG, R. und J. BLEIFUSS

Die mikrobielle Beeinflussung des Proteinkatabolismus im Fäulnisexperiment.
Beitr. gerichtl. Med. 34, 173-178 (1976)

DERVILLÉE, E. et B. BRUNET-ANTIGNY

Etude électrophorétique des protéines musculaires en médecine légale.
2^{e} note : Influences du milieu ambient.
Ann. méd. lég. 44, 555-559 (1964)

DERVILLÉE, E. et R. RIGOT

Etude électrophorétique du muscle squelettique en médicine légale.
1er note.
Ann. méd. lég. 43, 73-76 (1963)

EBASHI, S., EBASHI, F. and K. MARUYAMA

A new protein factor promoting contraction of actomyosin.
Nature (London) 203, 645-664 (1964)

ETLINGER, J.D., ZAK, R. and D.A. FISCHMAN

Compositional studies of myofibrils from rabbit striated muscle.
J. Cell Biol. 68, 123-141 (1976)

GOLL, D.E., SUZUKI, A., TEMPLE, J. and G.R. HOLMES

Studies on purified α-Actinin :
I. Effect of temperature and Tropomyosin on the α-Actinin/F-Actin interaction.
J. Mol. Biol. 67, 469-488 (1972)

HASSELBACH, W. und K. KRAMER

Muskel
Urban und Schwarzenberg Verlag, München, Berlin, Wien, (1975) 2. Auflage

HEILMEYER Jr., L.M.G., RÜEGG, J.C. and Th. WIELAND

Molecular Basis of Motility.
26. Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie, 10.-12. April 1975 in Mosbach/Baden
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1976

HUXLEY, H.E.

The mechanism of muscle contraction.
Science (Wash.D.C.) 164, 1356-1366 (1969)

KRAUSE, D. und L. ZETT

Physiologische und morphologische Untersuchungen zu Mechanismus und Verlauf der Totenstarre.
Rechtsmed. 72, 245-254 (1973)

LAKI, K.

in Contactile Proteins and Muscle (LAKI, K., ed.), pp. 1-96, Marcel Dekker, Inc., New York

LOWEY, S. and D. RISBY

Light chains from fast and slow muscle myosins.
Nature 234, 81-85 (1971)

LOWEY, S., SLAYTER, H.S., WEEDS, A.G. and H. BAKER

Substructure of the myosin molecule.
I. Subfragments of myosin by enzymatic degradation.
J. Mol. Biol. 42, 1-29 (1969)

MALLACH, H.J., MERKER, H.J. und J. WOLFF

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Struktur der Forellenmuskulatur und die Lokalisation der sauren ATPase im Verlaufe der Totenstarre.
Z. für Zellforschung 66, 794-810 (1965)

MASAKI, T., ENDO, M. and S. EBASHI

Localization of 6S component of -actinin at Z-band.
J. Biochem. (Tokyo) 62, 630-632 (1967)

MITTMEYER, H.-J.

Elektrophoretische Gewebeuntersuchungen unter thanatologischen Gesichtspunkten.
Beitr. gerichtl. Med. 36, 231-238 (1978)

OFFER, G., MOOS, C. and R. STARR

A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils.
J. Mol. Biol. 74, 653-676 (1973)

PORZIO, M.A. and A.M. PEARSON

Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
Biochim. Biophys. Acta 490, 27-34 (1977)

SCHMIDT, O., FORSTER, B. und G. SCHULZ

Untersuchungen über die Anteile der Eigen- und Fremdfermente am postmortalen Eiweißzerfall.
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 52, 28-45 (1961)

SCHWEND, R.J.

Elektrophoretische Untersuchungen auf Celluloseacetatfolien an menschlichen Gewebeeiweißkörpern und Serumproteinen unter thanatologischen Gesichtspunkten.
Inaug. Diss., Tübingen 1977

SCOPES, R.K. and I.F. PENNY

Subunit sizes of muscle proteins, as determined by sodium dodecylsulfate gel electrophoresis.
Biochim. Biophys. Acta 236, 409-414 (1971)

SENDER, P.M.

Muscle fibrils, solubilization and gel electrophoresis.
Febs letters 17, 106-110 (1971)

VÁNDOR, E. und L. JÓZSA

Postmortale Veränderungen in den myofibrillären Eiweißkomponenten und der myofibrillären Adenosintriphosphatasenaktivität der Skelettmuskulatur.
Z. Rechtsmed. 80, 265-272 (1978)

WEBER, K. and M. OSBORN

The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 224, 4406-4412 (1969)

WILKINSON, J.M., PERRY, S.V., COLE, H.A. and I.P. TRAYER

The regulatory proteins of the myofibril. Separation and biological activity of the components of inhibitory-factor preparations. Biochem. J. 127, 215-228 (1972)

Herrn Privatdozent Dr. med. H.-J. Mittmeyer danke ich für die Überlassung des Themas, für die vielen wertvollen und intensiven Diskussionen und die Begleitung der Arbeit.

LEBENSLAUF

Am 18. August 1947 wurde ich, Rudolf Erlinger, als Sohn des Dipl. Ing. Architekt Sigmund Erlinger und seiner Ehefrau Dr. phil. Lucia Erlinger, geb. Reitano, in Modena (Italien) geboren

Ich besuchte in Stuttgart-Hedelfingen die Grundschule und anschließend das Eberhard-Ludwigs-Gymnasium in Stuttgart, wo ich 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1968 begann ich das Studium der Biologie an der Universität Hohenheim. Das Diplom erwarb ich im Mai 1973 Anschließend erhielt ich durch ein Promotionsstipendium der Universität Hohenheim die Möglichkeit am Institut für Biologische Chemie bei Prof. Dr. J. Koch zu arbeiten. Am 9. November 1976 promovierte ich zum Dr. rer. nat..

Seit dem Sommersemester 1972 studiere ich Humanmedizin, zunächst an der Universität Hohenheim und dann an der Universität Tübingen. Die ärztliche Prüfung habe ich am 2. Mai 1979 abgelegt.

Die vorliegende Dissertation wurde im Sommer 1977 am Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen begonnen.

vervielfältigungen
f. u. t. müllerbader
Forststraße 18 · 7024 Filderstadt 4
Telefon (0711) 771567